

538,799

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/055095 A1

(51)国際特許分類:  
73/10, A61L 15/32, 27/22

C08G 69/40, 69/48,

(NAKASHIMA,Yoshikazu) [JP/JP]; 〒470-2345 愛知県  
知多郡 武豊町字西門8 シャトレ武豊25号室 Aichi  
(JP). 北野 茂 (KITANO,Shigeru) [JP/JP]; 〒140-0015  
東京都品川区西大井4-13-13 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP2002/013063

(22)国際出願日: 2002年12月13日 (13.12.2002)

(74)代理人: 酒井一, 外 (SAKAI,Hajime et al.); 〒102-  
0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地秀和紀尾井  
町TBビル Tokyo (JP).

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(81)指定国(国内): US.

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本油脂  
株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒150-0013  
東京都渋谷区恵比寿4丁目20番3号 Tokyo (JP).

(84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 小倉 敦  
彦 (OGURA,Atsuhiro) [JP/JP]; 〒300-0813 茨城  
県土浦市富士崎1-8-21 Ibaraki (JP). 田中 信  
治 (TANAKA,Shinji) [JP/JP]; 〒305-0045 茨城県  
つくば市梅園2-15-5 Ibaraki (JP). 中島 喜和

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: POLYMER, BIOABSORBABLE MATERIAL AND FILM FOR PREVENTING TISSUE FUSION

(54)発明の名称: ポリマー、生体内吸収性材料及び組織癒着防止膜

(57) Abstract: A novel A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup> type polymer useful in preventing tissue fusion which has an excellent bioabsorbability (i.e., disappearing within a definite time even in the case of being embedded in a large amount *in vivo*) and favorable mechanical characteristics and has a number-average molecular weight of from 10,000 to 100,000. This polymer consists of segments A<sup>1</sup> and A<sup>2</sup> having at least one of a modified amino acid group and an unmodified amino acid group and another segment B comprising PEG of a number-average molecular weight of from 8,000 to 50,000. This polymer contains both of the modified amino acid group and the unmodified amino acid group. The content of the modified amino acid amounts to 20 to 85% by mol based on the total amino acid content in the polymer. The segment A<sup>1</sup> attaches to one end of the segment B while the segment A<sup>2</sup> attaches to the other end thereof.

(57)要約:

体内に大量に埋入した場合でも所定期間内に消失しうる優れた生体内吸収性と、良好な力学的特性を有する組織癒着防止膜等に有用な数平均分子量が10000～100000の新規なA<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーであって、該ポリマーは、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の少なくとも一方を有するセグメントA<sup>1</sup>及びA<sup>2</sup>と、数平均分子量8000～50000のPEGからなるセグメントBとかなり、該ポリマーは、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方を含み、且つ該ポリマー中の全アミノ酸量に対する修飾アミノ酸の含有割合が20～85モル%であり、セグメントBの一端にセグメントA<sup>1</sup>、他端にセグメントA<sup>2</sup>が結合している。

WO 2004/055095 A1

## 明細書

## ポリマー、生体内吸収性材料及び組織癒着防止膜

## 技術分野

本発明は、生体内吸収性を示す新規な A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup> 型ポリマー、該ポリマーを利用した生体内吸収性材料、該生体内吸収性材料を利用した乾燥状態で良好な力学的強度と柔軟性を有し、生体内に埋入した場合に速やかに水分を吸収して含水ゲルを形成し、かつ体内に大量に埋入した場合でさえ一定期間内に分解吸収が可能な組織癒着防止膜に関する。

## 背景技術

生体材料に用いられる高分子材料は、非発熱性、非アレルギー性等の非毒性、組織及び生体へ適合させるための力学的特性、物質分離性、薬物徐放性等の用途に応じた機能が求められる。

例えば、外科手術後に起こる組織の癒着を防止するために癒着防止膜には、良好な組織への装着性、組織への非付着性及び低刺激性、手術後再摘出を不要とするための速やかな生体内吸収性、ハンドリングに影響する乾燥状態における優れた力学的強度及び弾性等が求められている。

しかし、従来の生体材料は、要求される機能性等のバランスが必ずしも満足しうるものでなく、これらの条件をバランスよく満足する材料の開発が望まれている。

従来、A-B-A 型のトリブロックコポリマーとして、セグメント B がポリエチレンゴリコール、セグメント B の両端であるセグメント A が、ポリ-β-ベンジル-L-アスパルテート(以下、PBLA と略す)又はポリ-γ-ベンジル-L-グルタメート(以下、PBLG と略す)等の修飾アミノ酸基であるポリマーが知られている(WO00/771602 号パンフレット)。このようなポリマーは、良好な力学的特性が得られるものの、生体内における崩壊速度が比較的遅く、体内に大量に埋入した場合、短期間に完全に消失しない場合が稀に認められる。

また、生体内吸収性材料としては、ヒアルロン酸、コラーゲン、カルボキシメチルセルロース、ポリカプロラクトン、再生セルロース、ポリ乳酸、ポリグリコール酸及びこれらのコポリマーが知られている。しかし、これらは何れも理想的な生体内吸収速度が得られ難いか、或いは力学的強度や弾性が不足している。

## 発明の開示

本発明の目的は、体内に大量に埋入した場合でも所定期間内に消失しうる、新規な A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマー及び該ポリマーを用いた生体内吸収性材料を提供することにある。

本発明の別の目的は、乾燥状態で良好な力学的特性を有し、且つ優れた生体内吸収性を示す生体内吸収性材料及び組織癒着防止膜を提供することにある。

本発明によれば、官能基が保護基により保護された修飾アミノ酸基及び官能基が保護基により保護されていない未修飾アミノ酸基の少なくとも一方を有するセグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>と、数平均分子量 8000～50000 のポリエチレングリコールからなるセグメント B とからなり、該セグメント B の一端にセグメント A<sup>1</sup>、他端にセグメント A<sup>2</sup>が結合した、A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーであって、該ポリマーが、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方を含み、且つ該ポリマー中の全アミノ酸量に対する修飾アミノ酸の含有割合が 20～85 モル%であり、該ポリマーの数平均分子量が 10000～100000 である A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーが提供される。

また本発明によれば、前記 A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーを含む生体内吸収性材料が提供される。

更に本発明によれば、前記生体内吸収性材料を膜状に成形した組織癒着防止膜が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1において合成された本発明にかかるポリマーの <sup>1</sup>H-NMR スペクトラムを示す図である。

図 2 は、実施例 1 及び 2、並びに比較例 2 及び 3 において調製された各ポリマーシートのマウス腹腔内における生分解性を測定した結果を示す図である。

図 3 は、実施例 1において合成された本発明にかかるポリマーを用いて作製した組織癒着防止膜及び市販の組織癒着防止膜の引張強度を測定した結果を示す図である。

図 4 は、実施例 1において合成された本発明にかかるポリマーを用いて作製した組織癒着防止膜の引張強度試験における応力一歪曲線を示す図である。

図 5 は、市販の組織癒着防止膜の引張強度試験における応力一歪曲線を示す図である。

#### 発明の好ましい実施の態様

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーは、特定分子量のポリエチレングリコール(以下、PEG

と略す)からなるセグメント B の両端に、特定のアミノ酸基を有するセグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>が結合した数平均分子量 10000~100000 のブロックポリマーである。

本発明のポリマーの数平均分子量が前記範囲外では、生体内吸収性の成形物とした際に求められる力学的特性及び非刺激性が満足できない。

前記セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>は、共に、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の少なくとも一方を有する。そして、本発明の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーは、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方を含有し、該ポリマー中の全アミノ酸量に対する非水溶性セグメントとしての修飾アミノ酸の含有割合は、20~85mol%、好ましくは 30~85mol%、更に好ましくは 35~80mol% である。

要するに、本発明のポリマーが、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方を含有するとは、セグメント A<sup>1</sup>又は A<sup>2</sup>の一方が修飾アミノ酸基のみからなる場合、他方は必ず未修飾アミノ酸基を含み、一方が未修飾アミノ酸基のみからなる場合、他方は必ず修飾アミノ酸基を含み、また、一方が修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方からなる場合、他方は、修飾アミノ酸基のみ、未修飾アミノ酸基のみ、若しくは修飾アミノ酸基と未修飾アミノ酸基との両方からなることを意味する。この際、セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>は、得られるポリマーを用いて調製するフィルム等の成形物の生体吸収速度を良好に調整し易くするために、共に修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方からなることが好ましい。また、セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>に含まれる修飾アミノ酸基及び/又は未修飾アミノ酸基は、同一でも異なっていても良く、セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>の分子量も同一でも異なっていても良い。

本発明のポリマー中の全アミノ酸量に対する修飾アミノ酸の含有割合が 20mol% 未満では、組織癒着防止膜とした際に、組織癒着性能が著しく低下し、85mol% を超えると、組織癒着防止性能が低下すると共に、生体内吸収性が著しく低下する。更に、このような範囲外では、理想的な生体内吸収速度が容易に得られない。理想的な生体内吸収速度は、該ポリマーを用いて調製された成形物の形状や用途によって異なるが、生体内に吸収されて消失するまでの期間が、通常 2 日~1 週間、より好ましくは 3~6 日間、更に好ましくは 4~6 日間となるような速度である。特に、前記成形物が組織癒着防止膜の場合には、生体内に吸収されて消失するまでの期間が、3~6 日間、更には 4~6 日間となるような速度が望ましい。

前記セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>に含まれる修飾アミノ酸基及び/又は未修飾アミノ酸基

の原料アミノ酸は、ホスゲン法により修飾アミノ酸-N-カルボン酸無水物(以下、NCAと略す)化が可能であり、且つ重合可能なアミノ酸であって、具体的にはアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、リシン、ヒスチジン、アルギニンである。特に、側鎖にカルボキシル基を有し、脂肪族又は芳香族を含むアルコールによってエステル化することにより疎水化可能な、即ち修飾アミノ酸とし易いアスパラギン酸又はグルタミン酸の使用が最も好ましい。このようなアミノ酸に付与したエステル結合は、生体内において容易に脱離させることができる。

前記セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>の少なくとも一方に含まれる修飾アミノ酸基は、ホスゲン法により NCA を合成する際に、アミノ酸の官能基であるカルボキシル基、アミノ基、水酸基、チオール基等が保護基によって保護されたアミノ酸基を意味する。従って、本発明において未修飾アミノ酸基とは、前記官能基が保護基によって保護されていないアミノ酸基、若しくはアミノ酸側鎖の官能基が金属等によって塩を形成しているアミノ酸基を意味する。

前記修飾アミノ酸基において、前記保護されるべき官能基がカルボキシル基の場合の保護基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、炭素数 5~18 の直鎖もしくは分岐の脂肪族基又は脂環基、ベンジル基等の芳香族基が挙げられる。

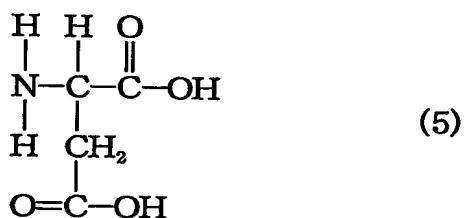
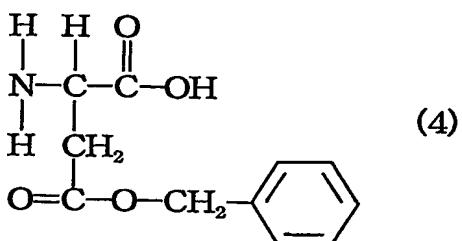
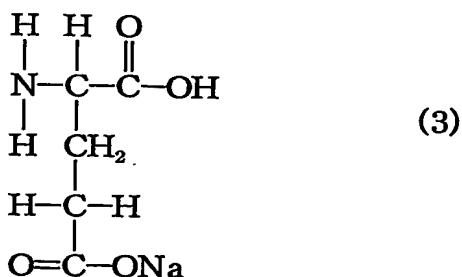
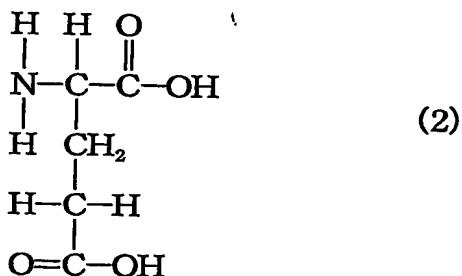
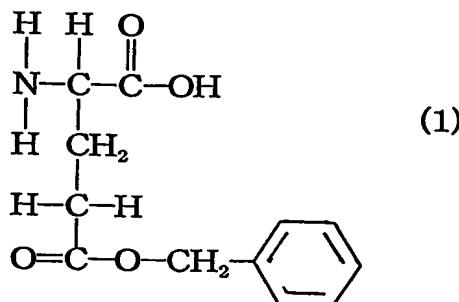
前記保護されるべき官能基がアミノ基又は水酸基の場合の保護基としては、アミド化に用いられるカルボン酸又はエステル化に用いられるカルボン酸から誘導される、例えば、アセチル基、プロピオニル基、炭素数 4~18 の直鎖もしくは分岐脂肪族又は脂環式カルボン酸から誘導される基、芳香族を含むカルボン酸から誘導される基が挙げられる。この際、芳香族を含む保護基の具体例としては、ベンジルオキシカルボニル基、ベンジル基、o-ニトロフェニルスルフェニル基が挙げられる。

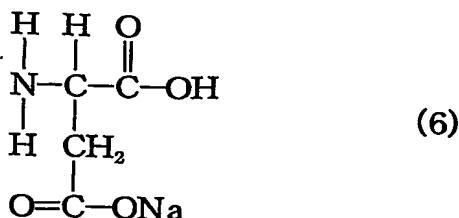
前記保護されるべき官能基がチオール基の場合の保護基としては、例えば、ベンジル基が挙げられる。

前記修飾アミノ酸基が有する保護基は、上述の具体例に限定されず、アミノ酸基における官能基を保護し、疎水性にしうる基であり、且つ生体内において容易に脱離させうる基であれば良い。

前記修飾アミノ酸基又は未修飾アミノ酸基を構成するアミノ酸の代表例としては、以下の式(1)に示される  $\gamma$ -ベンジルグルタミン酸(以下、BLG と略す)、式(2)に示され

るグルタミン酸(以下、Glu と略す)、式(3)に示されるグルタミン酸ナトリウム塩(以下、Glu·Na と略す)、式(4)に示される $\beta$ -ベンジルアスパラギン酸(以下、BLA と略す)、式(5)に示されるアスパラギン酸(以下、Asp と略す)、式(6)に示すアスパラギン酸ナトリウム塩(以下、Asp·Na と略す)が挙げられる。





前記セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>は、前記修飾アミノ酸からなるユニット及び／又は未修飾アミノ酸からなるユニットを有するポリアミノ酸により通常構成される。セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>を構成する前記ポリアミノ酸の合計の数平均分子量は、本発明の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーの数平均分子量に対して、通常 20～70%、望ましくは 25～65%、更に望ましくは 30～60% の数平均分子量である。前記ポリアミノ酸の合計の数平均分子量が、本発明のポリマーの数平均分子量に対して 20% 未満では、本発明のポリマーを用いて調製した膜等の力学的強度が不足するために望ましくなく、70% を超えると理想的な生体内吸収速度が容易に得られず、該膜の柔軟性が失われるために望ましくない。

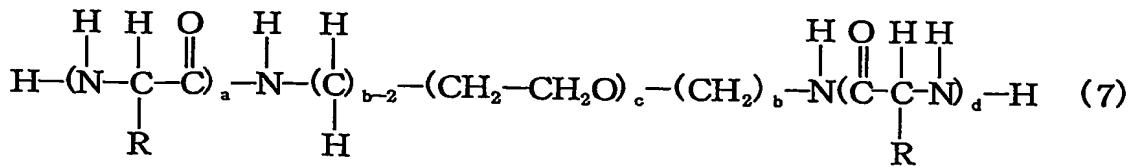
前記セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>を構成するポリアミノ酸の合計の数平均分子量は、得られるポリマーを用いて調製する膜等の力学的特性を良好にするために、通常 2000～70000、好ましくは 3000～60000、特に好ましくは 4000～40000、更に好ましくは 6000～14000 であり、セグメント A<sup>1</sup>又はセグメント A<sup>2</sup>を構成する個々のポリアミノ酸の数平均分子量は、通常 1000～35000、好ましくは 1500～30000、特に好ましくは 2000～20000、更に好ましくは 3000～7000 である。

本発明のポリマーにおいて前記セグメント B を構成する水溶性の PEG としては、例えば、アミノメチル基、アミノエチル基、アミノプロピル基等のアミノ基を両端に有する PEG が使用できる。

前記セグメント B の数平均分子量は、得られる本発明のポリマーを用いて調製する膜等に良好な生体内吸収性速度及び力学的特性をバランスし易く付与するために 8000～50000、好ましくは 10000～30000、特に好ましくは 11000～20000 とする必要がある。セグメント B の数平均分子量が 8000 未満では十分な物性が得られ難く、50000 を超える場合は、その原料である PEG の粘度が高くなり製造が困難である。

本発明のポリマーは、前記セグメント B の一端に前記セグメント A<sup>1</sup>、他端に前記セグメント A<sup>2</sup>が結合したポリマーであれば良く、セグメント B の両端におけるセグメント A<sup>1</sup>又は A<sup>2</sup>間の結合は特に限定されない。本発明のポリマーを、生体に対して低刺激性が要求される分野に使用する場合、例えば、式(7)で表されるポリマーが特に

望ましく挙げられる。



式(7)中、Rは同一又は異なっていても良く、 $-\text{CH}_2\text{COONa}$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 又は $-\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{H}_5$ を示す。a及びdはそれぞれ前記セグメント A<sup>1</sup>又はセグメント A<sup>2</sup>の繰り返し数であって、1以上、好ましくは5~100の整数である。bはセグメント Bとセグメント A<sup>1</sup>又はA<sup>2</sup>との結合部のメチレン基の繰り返し数であって、好ましくは1~10の整数である。cはオキシエチレン基の繰り返し数であって、好ましくは200~1200の整数である。本発明のポリマーにおいて、好ましい態様は、式(7)で示されるポリマーの1種又は2種以上の混合物である。尚、式(7)中の繰り返し数であるa、b、c、dは、上述の数平均分子量を基準として式(7)に当てはめた大まかな数字であるので必ずしも上記数値には限定されない。

本発明のポリマーを製造するには、例えば、セグメント Bを構成する両末端に1級アミノ基を有するPEGにNCAを開環付加重合させ、セグメント Bの両末端に修飾アミノ酸又はポリ修飾アミノ酸からなるセグメント Aを結合させたA-B-A型ポリマーを準備する工程(X)と、該A-B-A型ポリマーを、アルカリによる加水分解、接触水素添加反応又は酵素分解反応等によってセグメント Aを構成する修飾アミノ酸ユニットの修飾部分の一部を分解脱離させる工程(Y)を含む方法等により容易に得ることができる。

前記ポリマーの製造法において各セグメントの数平均分子量を調整するには、工程(X)に用いるPEGの分子量、NCAの添加量、並びに工程(Y)におけるセグメント Aからの修飾部分の分解脱離量を調整することにより容易に制御することができる。

前記工程(X)において、A-B-A型ポリマーは、市販品等の所望数平均分子量の、両末端に1級アミノ基を有するPEGを用い、公知の方法等により調製された所望のNCAを混合し、通常20~50°Cにおいて6~36時間、公知の開環付加重合させる方法等により得ることができる。この際、重合反応においては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(以下、DMFと略す)、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルアセトアミド、1,4-ジオキサン等の溶媒やこれらの溶媒とジクロロメタン又はクロロホルムとの混合溶媒を用いることができる。

前記工程(Y)において、セグメント A を構成する修飾アミノ酸ユニットの修飾部分の一部を分解脱離させるには、例えば、アルカリによる加水分解法の場合、得られるポリマーが、上述の本発明のポリマーにおける修飾アミノ酸含有量となるようにアルカリの添加量を調整し、通常 0~60°Cにおいて 0.1~1 時間、分解脱離反応させる方法等により行うことができる。前記アルカリによる加水分解法の代わりに、接触水素添加反応法又は酵素分解法を用いる場合も、得られるポリマーが、上述の本発明のポリマーにおける修飾アミノ酸含有量となるように、条件や酵素の種類、量等を適宜選択することにより実施することができる。

本発明の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーは、保水性、ハイドロゲル形成能、生体内吸収性等を有するので、後述する生体内吸収性材料や組織癒着防止膜の原材料としての用途の他に、トイレタリー製品や各種化粧品等の種々の製品原材料として応用展開することもできる。

本発明の生体内吸収性材料は、前記本発明の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーを含み、その成形物が生体に埋入される際に求められる力学的特性及び非刺激性を満足する材料である。

本発明の生体内吸収性材料は、本発明のポリマーの他に、必要に応じて生体内吸収性を示す公知のポリマー等の他の生体内吸収性ポリマーを含有していても良い。このような他の生体内吸収性ポリマーとしては、例えば、PBLA-PEG-PBLA トリブロックコポリマー、PBLG-PEG-PBLG トリブロックコポリマー、ヒアルロン酸、コラーゲン、カルボキシメチルセルロース、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸又はこれらのコポリマー等が挙げられる。

前記他の生体内吸収性ポリマーの配合割合は、本発明の生体内吸収性材料により調製した成形物が、所望の生体内吸収速度が得られ、且つ所望の力学的強度が得られるよう適宜選択できるが、通常、0~50 重量%が好ましい。

本発明の生体内吸収性材料は、例えば、キャスト法又は加熱溶融プレス法等により容易にシート状成形物とすることができますが、成形物の形態は特に限定されない。このような成形物は、通常、乾燥状態において良好な力学的強度とゴム弾性を有する。

本発明の生体内吸収性材料をシート状等の成形物とした場合、該成形物の生体内吸収速度の制御は、本発明の生体内吸収性材料に含まれる本発明の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーにおけるセグメント B、セグメント A<sup>1</sup> 及び A<sup>2</sup> の数平均分子量及び分子量比、成形物の形態や厚み、ポリマー中の未修飾アミノ酸と修飾アミノ酸との mol 比等を適宜調整

することによって容易に行うことができる。

本発明の組織癒着防止膜は、本発明の生体内吸収性材料をシート状又はフィルム状等に成形したものであって、その膜厚は特に限定されず、例えば、0.1～2mmからその適用箇所等に応じて適宜選択することができる。

本発明の組織癒着防止膜を製造するには、本発明の生体内吸収性材料を用いて、例えば、公知のキャスト法又は加熱溶融プレス法等により製膜する方法により得ることができると共に、前記本発明のポリマーの製造法における工程(X)により、セグメントBの両末端に修飾アミノ酸又はポリ修飾アミノ酸からなるセグメントAを結合させたA-B-A型ポリマーを準備し、必要により、該A-B-A型ポリマーに上述の他の生体内吸収性ポリマーや本発明のポリマーを適宜混合したポリマー材料を用いて、前述の公知の方法等により製膜した後、得られた膜を、前記本発明のポリマーの製造法において説明した工程(Y)におけるアルカリによる加水分解、接触水素添加反応又は酵素分解反応等によって処理し、膜を構成するセグメントAにおける修飾アミノ酸ユニットの修飾部分の一部を分解脱離させる方法等によっても得ることができる。

本発明の組織癒着防止膜は、理想的な生体内吸収速度を得るために、膜中に含まれる全アミノ酸量に対する修飾アミノ酸の含有割合が、20～85mol%、特に30～85mol%、更には35～80mol%であることが好ましく、更にまた膜自体が実質的に本発明のポリマーにより構成されることが望ましい。

本発明の組織癒着防止膜は、水中でハイドロゲルを形成し、該ハイドロゲルは十分な柔軟性を有し、水中で膨潤した状態のまま室温において長期静置しても膨潤直後の形態が失われることはない。従って、本発明の組織癒着防止膜は、該膜を、人を含む動物の組織に装着する際のハンドリング性に優れると共に、ゲル化後の軟組織に対する追従性にも優れる。

#### 実施例

以下、実施例に基づき本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。例中の分析方法及び条件等を以下に示す。

##### <<sup>1</sup>H-NMRの測定方法(1)>

機種：日本電子(株)製、JNM EX270、溶媒： $D_2O$ (0.5N NaOH含有)、内部標準： $H_2O$ (4.70ppm)。

##### <<sup>1</sup>H-NMRの測定方法(2)>

機種：日本電子(株)製、JNM EX270、溶媒：DMSO-d<sub>6</sub>、測定温度：80°C、内部標準：DMSO(2.62ppm)。

<生体内組織吸収性シートの作製方法(1)>

ポリマー500mgを100°Cに加熱した金属板に挟み、3分間軟化させた後、10MPaの荷重を3分間かける。冷却後フィルムを剥離させて、無色半透明のシートを得る。本発明による全ての実施例におけるポリマーにより調製されたシートは、水中に投入することにより徐々に膨潤し、無色透明のハイドロゲルが形成された。

<生体内組織吸収性シートの作製方法(2)>

ポリマー500mgを5mlの塩化メチレンに完全に溶解させる。このポリマー溶液をポリテトラフルオロエチレン樹脂製のシャーレ上にキャストし、室温で1時間溶媒を蒸散させる。次に、このシャーレを60°Cに設定した高温相中で、更に1時間乾燥させ、無色半透明のシートを得る。

<生体内吸収性試験>

生体内吸収性試験は、まず、一辺2cmの正方形に裁断した前記試料シートを、開腹した8週齢の雄性ddyマウスの腹腔内へ埋入する。ついで、このシートが組織表面の体液を吸収し組織に接着し、迅速に柔軟化して周囲軟組織に対して追従性を示すことを確認した後、腹膜を縫合する。このようなシートが埋入されたマウスを、翌日から3日間飼育し毎日3匹ずつ屠殺して開腹後、埋入したシートを取り出し、乾燥重量を測定する。この測定結果と、埋入前のシート重量との差を求め生体内吸収性の試験結果とする。

<癒着防止試験>

癒着防止試験は、まず、7週齢の雌性Wistarラットの腸骨静脈基部を3-0綱糸で結紮し止血後、約1mm下流を切断する。処置全域に試料の前記シートを貼付し、腹膜及び皮膚を縫合する。1週間後に開腹し、生体組織に対する癒着の有無を判定する。癒着防止率は以下の式に従って算出する。

$$\text{癒着防止率}(\%) = (\text{癒着無し} / \text{全数} (= \text{癒着有り} + \text{癒着無し})) \times 100$$

<引張試験>

シートの厚みを測定した後、約2mm幅の短冊状に裁断する。各サンプルにつき10回ずつ測定を行い、8点の平均値を求めて結果とする。また、最大荷重は8点の平均値を断面積で除して求める。

実施例 1

## [ポリマーの合成]

乾燥不活性ガス雰囲気下、両末端にアミノ基を有する PEG(20000g/mol)1.0g を 40°C の油浴中で DMF 7ml に溶解し、 $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物(以下、BLA-NCA と略す)800mg(PEG に対して 64 当量)を加えた。1 晩反応させた後に、氷冷したジイソプロピルエーテルに滴下し、白色の固形物を沈析させた。固形分を吸引ろ過した後に、塩化メチレンに溶解し、晶析操作を繰り返し、減圧乾燥して PBLA-PEG-PBLA 構造のブロックコポリマーを得た。

該ブロックコポリマー 1.0g をクロロホルム 10ml に再溶解させ、0.43 規定の水酸化ナトリウム溶液 0.78ml を添加した。室温で 10 分間反応させた後に、ジイソプロピルエーテル中に滴下し、白色の固形分を沈析させた。固形分を吸引ろ過した後に、減圧乾燥し、A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型の PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーを得た。

得られたポリマーについて、GPC により表 1 に示す各数平均分子量を測定した。結果を表 1 に示す。

[<sup>1</sup>H-NMR の測定]

前記 <sup>1</sup>H-NMR の測定方法(1)に従い、得られた PBLA-PEG-PBLA 構造のブロックコポリマー及び PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーの <sup>1</sup>H-NMR を測定した。両者の BLA 結合量より、以下の式に従って結合 BLA 含量を算出した。尚、算出にあたっては <sup>1</sup>H-NMR の 3.6ppm 及び 7.3ppm のピーク面積を用いて結合 BLA 含量を求めた。

$$\text{BLA 含量}(\%) = [\text{PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーの結合 BLA 含量} / \text{A}^1\text{-B-A}^2\text{型ブロックコポリマーの BLA 結合量}] \times 100$$

得られたポリマー中の全アミノ酸含量に対する BLA 含量を表 1 に示す。また、PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーの <sup>1</sup>H-NMR スペクトラムを図 1 に示す。

## [生体内分解性シートの作製及び生体内分解性試験]

このように合成した PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーを用いて前記生体内吸収性シートの作製方法(1)に従い生体内吸収性シートを作製した。

得られたシートについて、前記生体内吸収性試験に従い、開腹した 8 週齢の雄性 ddy マウスの腹腔内へ PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーシートを埋入し、手術経過後の残存重量を測定した。結果を図 2 に示す。

図 2 よりシート埋入から 3 日後ではシートが完全に消失しておらず、6 日後には完

全に消失しており、開腹部の生体組織の修復に要する時間からみて、3日間ではまだ不十分であり、1週間程度で十分傷口が修復していると考えられ理想的であった。

#### [癒着防止試験]

前記癒着防止試験に従い、表1に示す数のラットを用いて前記で作製したシートについて癒着防止試験を行った。結果を表1に示す。

#### [引張試験]

前記で作製したシートを用いて、前記引張試験に従い、引張強度試験を行った。この際、ヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロースとを2:1(モル比)で含有する市販の合成吸収性癒着防止シート(以下、ヒアルロン酸Na・CMCと略す。Genzyme社製)についても同様な試験を行った。結果を図3に示す。また、本実施例のシートの応力一歪曲線を図4に、市販のヒアルロン酸Na・CMCの応力一歪曲線を図5にそれぞれ示す。

図3より、得られたシートは引張強度には劣るが歪みが大きくしなやかなシートであることがわかる。また、図4及び5より、本実施例のシートは降伏点以後破断せず、塑性変形が認められるため、市販の前記シートよりハンドリングが良いことが判る。

#### 実施例2

PEGを、両末端にアミノ基を有するPEG(11000g/mol)とし、水酸化ナトリウム溶液の使用量を1.86mlとした以外は実施例1と同様の操作を行い、PBLA-PEG-PBLA構造のブロックポリマー及びA<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型のPEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーを得た。

得られた各ポリマーを用いて、実施例1と同様に各数平均分子量の測定、<sup>1</sup>H-NMRの測定、BLA含量の算出、生体内吸収性シートの作製及び各試験を行った。生体内吸収性試験の結果を図2に、各数平均分子量、BLA含量及び癒着防止試験の結果を表1に示す。

#### 実施例3

BLA-NCA量をPEGに対して100当量とし、水酸化ナトリウム溶液の使用量を1.80mlとした以外は実施例1と同様の操作を行い、PBLA-PEG-PBLA構造のブロックポリマー及びA<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型のPEG-P(BLA,Asp·Na,Asp)ポリマーを得た。

得られた各ポリマーを用いて、実施例1と同様に各数平均分子量の測定、<sup>1</sup>H-NMRの測定、BLA含量の算出、生体内吸収性シートの作製及び各試験を行った。生体内吸収性試験の結果を図2に、各数平均分子量、BLA含量及び癒着防止試験の結果を表1

に示す。

#### 実施例 4

BLA-NCA の代わりに  $\gamma$ -ベンジル-L-グルタメート-N-カルボン酸無水物(以下、BLG-NCA と略す)を用いた以外は実施例 1 と同様の操作を行い、PBLG-PEG-PBLG 構造のブロックポリマー及び A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型の PEG-P(BLG, Glu·Na, Glu)ポリマーを得た。

得られた各ポリマーを用いて、実施例 1 と同様に各数平均分子量の測定、<sup>1</sup>H-NMR の測定、BLG 含量の算出、生体内分解性シートの作製及び各試験を行った。生体内分解性試験の結果を図 2 に、各数平均分子量、BLG 含量及び癒着防止試験の結果を表 1 に示す。

#### 比較例 1

癒着防止膜を用いないで癒着防止試験を行った。結果を表 1 に示す。

#### 比較例 2

実施例 1 で合成した PBLA-PEG-PBLA 構造のブロックポリマーを用いて生体内吸収性シートを作製し、数平均分子量の測定、BLA 含量の算出及び癒着防止試験を実施例 1 と同様に行った。結果を表 1 に示す。また、実施例 1 と同様に生体内吸収性試験を行った。結果を図 2 に示す。

#### 比較例 3

PEG として、両末端にアミノ基を有する PEG(4000g/mol)を用い、BLA-NCA の使用量を 1.74g(PEG に対して 28 当量)とした以外は実施例 1 と同様に PBLA-PEG-PBLA 構造のブロックコポリマーを得た。

得られたブロックコポリマーを用いて生体内吸収性シートを作製し、数平均分子量の測定、BLA 含量の算出及び癒着防止試験を実施例 1 と同様に行った。結果を表 1 に示す。また、実施例 1 と同様に生体内吸収性試験を行った。結果を図 2 に示す。

#### 比較例 4

PEG として、両末端にアミノ基を有する PEG(11000g/mol)を用い、水酸化ナトリウム溶液の使用量を 3.34ml とした以外は実施例 1 と同様に操作を行い、PBLA-PEG-PBLA 構造のブロックポリマー及び A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型の PEG-P(BLA, Asp·Na, Asp)ポリマーを得た。

得られた PEG-P(BLA, Asp·Na, Asp)ポリマーを用いて実施例 1 と同様に生体内吸収性シートを作製し、実施例 1 と同様に各数平均分子量の測定、BLA 含量の算出、生体

内吸收性シートの作製及び癒着防止試験を行った。結果を表 1 に示す。

比較例 5

水酸化ナトリウム溶液の使用量を 0.26ml とした以外は実施例 1 と同様に操作を行い、PBLA-PEG-PBLA 構造のブロックポリマー及び A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型の PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp) ポリマーを得た。

得られた PEG-P(BLA,Asp·Na,Asp) ポリマーを用いて実施例 1 と同様に生体内吸收性シートを作製し、実施例 1 と同様に各数平均分子量の測定、BLA 含量の算出、生体内吸收性シートの作製及び癒着防止試験を行った。結果を表 1 に示す。

比較例 6

市販のヒアルロン酸 Na·CMC を用いて、実施例 1 と同様に癒着防止試験を行った。結果を表 1 に示す。

表 1

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	比較例 1	比較例 2	比較例 3	比較例 4	比較例 5	比較例 6
成 分	PEG の数平均分子量 20000	11000	20000	—	20000	4000	11000	20000	—
	アミノ酸の数平均分子量 8500	7500	7500	—	10000	2000	5500	9500	—
	ホリマーの数平均分子量 28500	27500	27500	—	30000	6000	16500	29500	—
修飾アミノ酸含量(mol%)	70	50	50	—	100	100	10	90	—
癒着あり(匹)	4	5	4	9	16	14	14	13	12
癒着なし(匹)	16	15	15	1	3	5	4	5	6
試験数(匹)	20	20	19	10	19	19	18	18	18
癒着防止率	80	75	79	10	16	27	22	28	33
シート残存	なし	なし	なし	—	あり	なし	なし	あり	なし

以上の各試験の結果、本発明のポリマーを用いた実施例においては、生体内吸収性材料をシート状とした組織癒着防止膜をラットの腹腔内に大量に埋入した場合においても、ラットに異常は全く認められず、かつ、1週間後を開腹するとシートは完全に分解されて消失し、術部の癒着が起こらないという優れた効果が得られた。比較例2で用いたようなPBLA-PEG-PBLAブロックコポリマーシートをラットの腹腔内に大量に埋入した場合、シートが完全に消失せず、長期にわたって体内に残存する場合があることが確認されている。実際の手術では、組織癒着防止膜を一度に複数枚使用するケースが頻繁にあることから、本発明のような良好な生体組織内吸収性は顕著な利点である。

また、市販のヒアルロン酸Na・CMCが硬くて脆い材料であり使用時に破損する危険性が高いのに対し、実施例1で作製されたシートは、乾燥状態で500%以上伸張させた場合でも破断しないといった優れた力学的特性が得られた。実際に、本発明のポリマーを用いて作製されたシートは腹腔内に挿入した場合、シートによる軟組織の損傷やシート自身の破損は全くなく、かつ、腹腔内の水分を吸収し軟組織に接着した。従って、本発明のポリマーは、生体内分解性材料及び組織癒着防止膜等に好適であることが確認できた。

## 請求の範囲

1)官能基が保護基により保護された修飾アミノ酸基及び官能基が保護基により保護されていない未修飾アミノ酸基の少なくとも一方を有するセグメント A<sup>1</sup>及びA<sup>2</sup>と、数平均分子量 8000～50000 のポリエチレングリコールからなるセグメント B とかなり、該セグメント B の一端にセグメント A<sup>1</sup>、他端にセグメント A<sup>2</sup>が結合した、A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーであって、

該ポリマーが、修飾アミノ酸基及び未修飾アミノ酸基の両方を含み、且つ該ポリマー中の全アミノ酸量に対する修飾アミノ酸の含有割合が 20～85 モル%であり、該ポリマーの数平均分子量が 10000～100000 である A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマー。

2)セグメント A<sup>1</sup>及び A<sup>2</sup>の数平均分子量の合計が、A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーの数平均分子量の 20～70%である請求の範囲 1 の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマー。

3)修飾アミノ酸基の保護基が、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、o-ニトロフェニルスルフェニル基、炭素数 4～18 の脂肪族基及び炭素数 4～18 脂環基からなる群より選択される請求の範囲 1 の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマー。

4)修飾アミノ基及び未修飾アミノ酸基の原料アミノ酸が、L-グルタミン酸及び L-アスパラギン酸からなる群より選択される少なくとも 1 種である請求の範囲 1 の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマー。

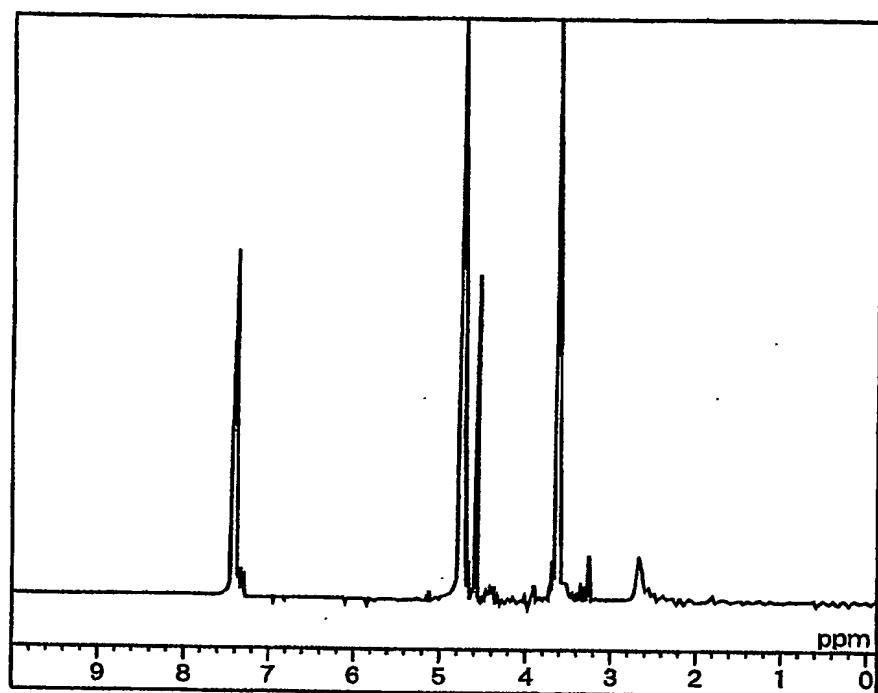
5)修飾アミノ酸基が、β-ベンジル-L-アスパルテート及びγ-ベンジル-L-グルタメートからなる群より選択される請求の範囲 1 の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマー。

6)請求の範囲 1 の A<sup>1</sup>-B-A<sup>2</sup>型ポリマーを含む生体内吸収性材料。

7)請求の範囲 6 の生体内吸収性材料を膜状に成形して得た組織癒着防止膜。

8)膜中に含まれる全アミノ酸量に対する修飾アミノ酸の含有割合が 20～85mol%である請求の範囲 7 の組織癒着防止膜。

1/3

**FIG 1**

2/3

図2

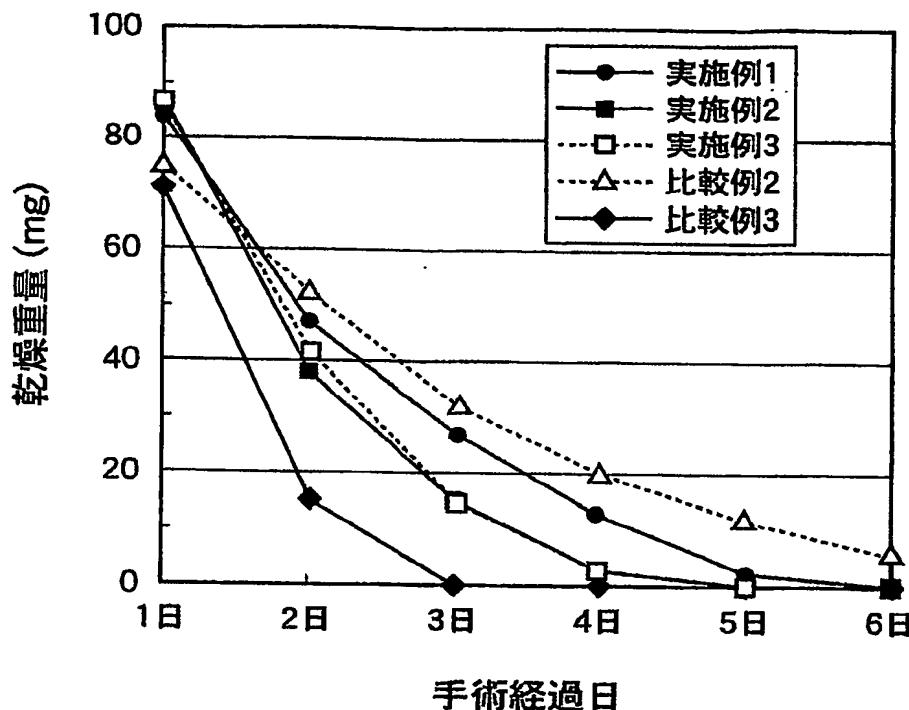
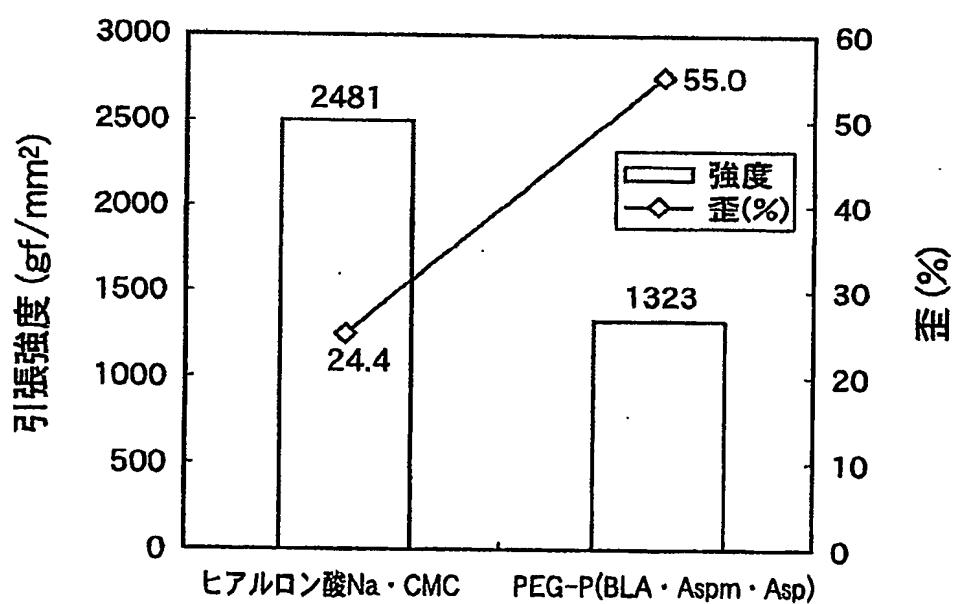


図3



3/3

図4

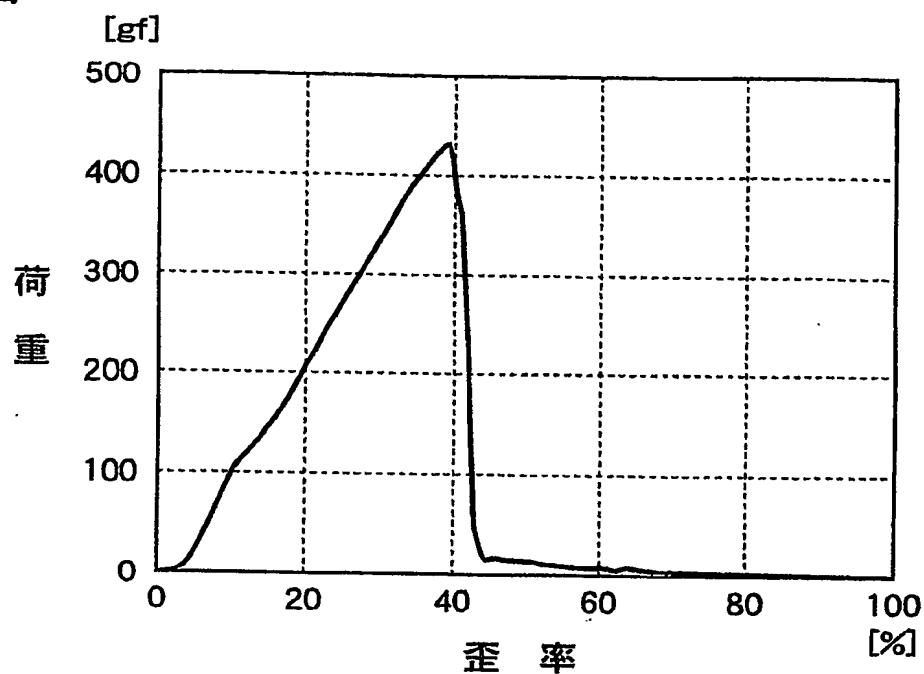
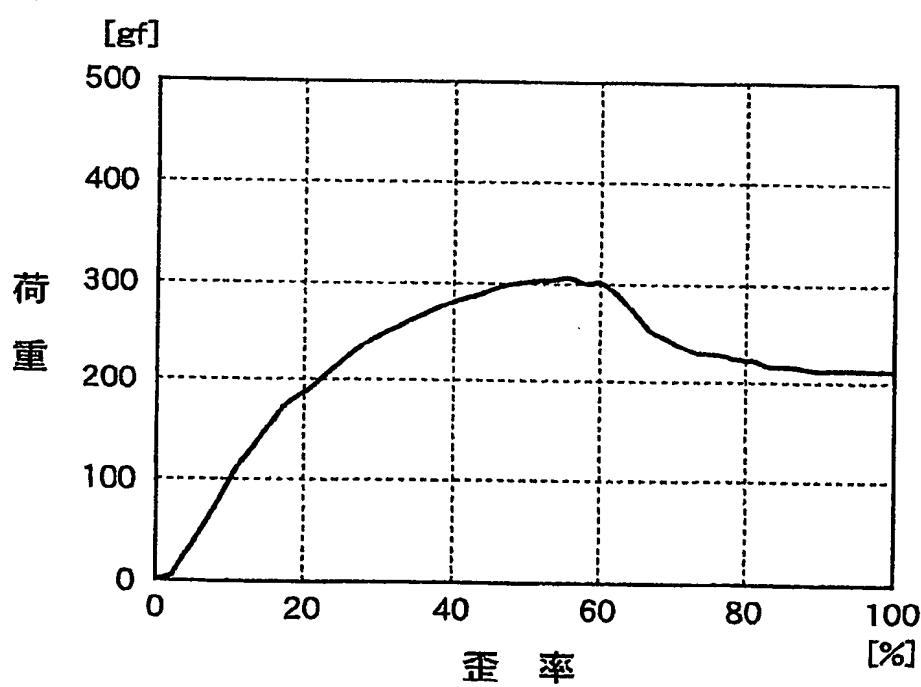


図5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13063

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C08G69/40, C08G69/48, C08G73/10, A61L15/32, A61L27/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08G69/40, C08G69/48, C08G73/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), JOIS (JICST FILE)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	JP 2002-371131 A (NOF Corp.), 26 December, 2002 (26.12.02), Claims (Family: none)	1-8
A	WO 00/71602 A1 (NOF Corp.), 30 November, 2000 (30.11.00), Claims & EP 1203784 A1	1-8
A	Shinji TANAKA et al., "Polyethylene Glycol Middle Segment to suru Triblock Kyojugotai no Gosei to Bussei", Polymer Preprints, Japan, Vol.51, No.10, The Society of Polymer Science, Japan, 2002, pages 2515 to 2516	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 27 February, 2003 (27.02.03)	Date of mailing of the international search report 11 March, 2003 (11.03.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/13063

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 4-507101 A (Serbio), 10 December, 1992 (10.12.92), Claims & EP 472670 A1 & US 5225532 A	1-8

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C08G69/40、C08G69/48、C08G73/10、A61L15/32、  
A61L27/22

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C08G69/40、C08G69/48、C08G73/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

JOIS(JICST科学技術文献ファイル)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EX	JP 2002-371131 A (日本油脂株式会社) 2002.12.26, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8
A	WO 00/71602 A1 (日本油脂株式会社) 2000.11.30, 特許請求の範囲 & EP 1203784 A1	1-8
A	田中信治他、ポリエチレングリコールをミドルセグメントとするトリプロック共重合体の合成と物性、高分子学会予稿集、51巻10号、高分子学会、2002、p. 2515-2516	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.02.03

国際調査報告の発送日

11.03.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

小出直也

4J 3041



電話番号 03-3581-1101 内線 3455

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 4-507101 A (セルビオ) 1992. 12. 10, 特許請求の範囲 & EP 472670 A1 & US 5225532 A	1-8